

بررسی ارتباط پلی مورفیسم تکرار دی نوکلئوتید CA در اینترون یک ژن NF B1 با خطر ابتلا به سرطان پستان

الهه کمالی^۱، منوچهر توسلی^{۲*}، سیمین همتی^۳

^۱دانشجو، گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران؛ ^۲گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران؛ ^۳گروه پرتو درمانی،

دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۳۰

چکیده:

زمینه و هدف: ژن NF B1 زیر واحد اتصال به DNA در کمپلکس NF- B را کد می کند. تزايد بیان این ژن در برخی سرطان ها از جمله سرطان پستان گزارش شده است. در این مطالعه، وجود پلی مورفیسم تکرار CA در اینترون یک ژن NF B1 و ارتباط آن با خطر ابتلا به سرطان پستان در جمعیت اصفهان مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: این مطالعه ی مورد- شاهد، بر روی ۱۱۵ زن مبتلا به سرطان پستان و ۱۱۵ زن سالم صورت گرفت. پس از استخراج DNA از نمونه های خون افراد مورد مطالعه، توالی مورد نظر توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز تکثیر گردید. در نهایت پلی مورفیسم تکرار CA توسط الکتروفورز قطعات تکثیر شده بر روی ژل پلی اکریل آمید و تعیین توالی مشخص شد.

یافته ها: بر طبق نتایج حاصل از این مطالعه، نه الل مختلف تکرار CA در محدوده ی ۱۴ تا ۲۳ تکرار در اینترون یک این ژن مشخص شد. بیشترین فراوانی اللی در هر دو گروه بیمار (۲۷٪) و کنترل (۲۸/۶۹٪) متعلق به الل ۱۶ (CA) بود. با توجه به فراوانی الل کوتاه ۱۴ (CA) در افراد بیمار (۳/۰۴٪) و کنترل (۰٪)، زنان حامل الل ۱۴ (CA) ژن NF B1 به طور قابل توجهی در معرض خطر بالاتری برای ابتلا به سرطان پستان قرار دارند.

نتیجه گیری: از آنجا که الل ۱۴ تکرار CA تنها در افراد بیمار مشاهده شد و با توجه به نسبت افزایش بزرگتر از هشت، ممکن است این تکرار اللی بتواند به عنوان یک مارکر پیش آگاهی سرطان پستان مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: سرطان پستان، فاکتور هسته ای B1 (NF B1)، تکرار CA، پلی مورفیسم.

مقدمه:

کشورهای در حال توسعه و همچنین ایران، یک دهه زودتر از کشورهای توسعه یافته است (۵). از نظر شیوع سرطان پستان در استان های کشور، استان اصفهان با شیوع ۲۰/۶۱ درصد در هزار، دومین استان شایع بعد از یزد گزارش شده است (۶، ۷). فاکتور هسته ای B خانواده ای از فاکتورهای رونویسی یوکاریوتی است که در رونویسی بیش از ۵۰۰ ژن دخیل در فرآیندهای بیولوژیکی گسترده از جمله کنترل سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی، التهاب، پاسخ به استرس، تکامل، تکثیر، تمایز، بقا، چسبندگی سلولی، رگ زایی و آپوپتوز دخالت

سرطان یک مشکل اصلی سلامت عمومی و دومین عامل منجر به مرگ در سراسر جهان و سومین عامل مرگ در ایران پس از بیماری های قلبی- عروقی و حوادث است (۱). شیوع سرطان پستان در ایران در سال های اخیر افزایش یافته (۲) به نحوی که طی ۳۰ سال اخیر، دو برابر شده است (۳). سرطان پستان شایع ترین سرطان در میان زنان ایرانی است (۴) و ۲۴/۴ درصد کل سرطان ها در میان زنان را به خود اختصاص می دهد (۵). در کشور ما از هر ۱۰ تا ۱۵ زن، احتمال ابتلای یک زن به سرطان پستان وجود دارد؛ اما سن بروز آن در

دارند و اختلال در عملکرد آن‌ها می‌تواند با طیف وسیعی از بیماری‌ها شامل نقایص سیستم ایمنی، دیابت، بیماری‌های التهابی نظیر MS، دیابت، آلزایمر، بیماری‌های قلبی-عروقی، آسم و به ویژه سرطان همراه باشد (۸، ۹). NF B در انواعی از بدخیمی‌ها از جمله سرطان پروستات (۱۰)، پستان (۱۱)، کلورکتال (۱۲)، پانکراس (۱۳) و معده (۱۴) به شکل پایداری فعال می‌گردد. به تازگی مطالعه‌ای در زمینه‌ی بررسی اهمیت NF B به عنوان یک مارکر پیش‌آگهی‌دهنده در سرطان پستان و ارتباط آن با درجه یا گرید تومور، وضعیت غدد لنفاوی، بیان ریسپتورهای هورمونی و HER2/neu نیز صورت گرفته است. بر طبق نتایج این مطالعه، NF B به شکل قابل توجهی با اندازه‌ی بزرگ تومور ($>5\text{cm}$)، درجات بالای تومور، وضعیت منفی ریسپتورهای استروژن (ER منفی) و پروژسترون (PR منفی) و HER2/neu مثبت مرتبط است؛ بنابراین به نظر می‌رسد بیان NF B با فنوتیپ تهاجمی سرطان پستان همراه باشد و ارتباط واضحی بین تریاد بیان NF B و موارد پاتولوژیکی ذکر شده برقرار است و بیماران با تومورهای NF B مثبت باید به شدت تحت درمان قرار گیرند (۱۵). مهمترین عضو خانواده فاکتورهای رونویسی NF B، از دو زیر واحد P50 (NFKB1) و P65 تشکیل شده است. NF B1 علاوه بر شرکت در ساختمان NF B دارای نقش‌های مستقل نیز می‌باشد. در زمینه‌ی ارتباط ژن NF B1 با سرطان، موتاسیون‌های سوماتیک این ژن در نمونه‌های سرطانی پستان (۱۶) و تریاد بیان آن در انواعی از سرطان‌های انسانی از جمله سرطان‌های ریه، کولون، پروستات، استخوان، مغز و پستان مشاهده شده است (۱۷، ۱۸). به علاوه در بررسی زیرواحدهای مختلف NF- B/Rel در تومورهای انسانی پستان، مشخص شده که زیرواحدهای p50 p52 و cRel در هسته‌ی تقریباً تمام نمونه‌های سرطانی پستان حضور دارند و به نظر می‌رسد افزایش فعالیت فاکتور رونویسی NF- B در اتصال به DNA در سلول‌های سرطانی پستان به خاطر افزایش زیرواحدهای مذکور

باشد. افزایش میزان mRNA ی NF B1 نیز در سلول‌های سرطانی پستان مشاهده شده (۱۸) که ممکن است به خاطر افزایش رونویسی آن توسط کمپلکس‌های فعال NF- B باشد (۱۹). ژن NF B1 به طول ۱۵۶ کیلو باز، بزرگترین ژن در خانواده‌ی NF B محسوب می‌شود و در ناحیه‌ی 4q23-q24 واقع شده و زیر واحد اتصال به DNA (p50/p105) در کمپلکس پروتئینی NF- B را کد می‌کند. این ژن دارای ۲۴ اگزون و ۳۴ اینترون مجزا (۳۳ اینترون GT-AG و یک اینترون GC-AG) است (۲۰). تکرارهای دو نوکلئوتیدی رایج‌ترین تکرارهای پراکنده در ژنوم هستند و اغلب توالی‌های تکراری طول‌های متفاوتی نشان می‌دهند. تحقیقات نشان داده است که تکرارهای دو نوکلئوتیدی می‌توانند در کاهش یا افزایش بیان ژن و همچنین در پیرایش متناوب (Alternative splicing) مؤثر باشند (۲۱). تاکنون مطالعه‌ای در زمینه‌ی وجود پلی مورفیسم تعداد تکرارهای ریز ماهواره‌ی CA در اینترون شماره یک ژن NF B1 و ارتباط آن با خطر ابتلا به سرطان پستان صورت نگرفته است. در پژوهش حاضر به کمک یک مطالعه مورد-شاهد در جمعیت اصفهان، ارتباط مذکور مورد بررسی و نتایج آن مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

روش بررسی:

طی این مطالعه‌ی مورد-شاهد در جمعیت اصفهان، نمونه‌گیری خون از ۱۱۵ زن مبتلا به سرطان پستان در محدوده‌ی سنی ۸۰-۲۵ سال با مراجعه به واحد نمونه‌گیری بیمارستان سیدالشهدای اصفهان و ۱۱۵ زن سالم در سنین بالاتر از ۴۵ سال و از بین مراجعین آزمایشگاه کلینیکال بیمارستان الزهرا و آزمایشگاه مهدیه که فاقد سابقه خانوادگی ابتلا به سرطان به خصوص سرطان پستان بودند، صورت گرفت. اطلاعات بالینی لازم با پرسش از افراد شاهد و مطالعه‌ی پرونده‌ی بیماران پس از کسب رضایت از ایشان و مطلع‌سازی آن‌ها از هدف تحقیق حاضر به دست آمد. DNA ژنومی به روش

مارکرهای ویژه جهت تعیین طول دقیق تکرارهای CA در سایر نمونه‌های بیمار و کنترل استفاده شد.

مطالعات آماری این پژوهش و بررسی نتایج توسط نرم‌افزار SPSS و سرویس اینترنتی SISA (<http://home.clera.net/sisa/>) انجام گردید؛ ابتدا ترکیبات الی و میزان فراوانی ال‌ها در جمعیت مورد مطالعه تعیین شد و در نهایت ارتباط این تکرارها با بروز سرطان پستان در جمعیت به کمک آزمون‌های مربع کای (2) و نسبت افزایشده (Odds Ratio) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها:

در میان افراد بیمار و کنترل مورد بررسی در این پژوهش، نه ال متفاوت در محدوده بین ۱۴ تا ۲۳ تکرار CA مشاهده شد. از بین این ال‌ها، ال ۱۶ تکرار CA شایع‌ترین ال ژن NF B1 در بین بیماران (۲۷ درصد) و افراد کنترل (۲۸/۶۹ درصد) برآورد شد. دو ال ۱۷ تکرار و ۱۸ تکرار CA نیز دومین و سومین ال شایع در کل افراد مورد بررسی و به ترتیب با فراوانی ۲۰/۴۳ درصد و ۲۰ درصد محسوب می‌گردند. کمترین فراوانی مربوط به تکرار CA در بیماران متعلق به ال ۲۳ تکرار (۰/۴۳ درصد) بود؛ همچنین در افراد کنترل متعلق به ال ۱۴ تکرار هیچ فراوانی ای مشاهده نشد.

رسوب نمکی (Salting out) از نمونه‌های خون افراد مورد آزمایش استخراج گردید (۲۲). سپس ناحیه‌ی حاوی پلی‌مورفیسم مورد نظر توسط پرایمرهای طراحی شده‌ی پیشرو (5-TAGGAGAGTCTATTCATCCCTC-3) و پیرو (3-AGTGCTCTA AGTATCCAGGTAG-5) تکثیر شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۰۰ تا ۲۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲/۵ میکرولیتر از X بافر PCR، ۱/۵ میکرولیتر Mgcl2، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای پیشرو و پیرو و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم SmarTaq DNA polymerase در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. صحت محصولات حاصل از واکنش PCR بعد از بهینه سازی دما و غلظت Mgcl2، توسط ژل آگارز ۱٪ تأیید شد و به خاطر درصد تفکیک پایین ژل آگارز و به منظور تعیین دقیق طول محصولات، از روش الکتروفورز عمودی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۰ درصد استفاده گردید. بعد از اتمام مدت زمان ران شدن، ژل به روش نیرات نقره رنگ‌آمیزی و پس از ظهور باندهای DNA، نتایج توسط اسکنر ثبت شد. بعد از تفکیک الی و بررسی نمونه‌ها بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۰ درصد، یک نمونه واجد بلندترین ال، یک نمونه واجد کوتاهترین ال و یک نمونه‌ی هتروزیگوت جهت تعیین توالی انتخاب شد و به شرکت سیناکلون تهران ارسال گردید و از آن‌ها به عنوان

جدول شماره ۱: فراوانی الی و نسبت خطر (Odds Ratio) ال‌های تکرار CA واقع در ناحیه‌ی ایترونی ژن

NFKB1 در بیماران و افراد کنترل در جمعیت اصفهان

ال	فراوانی الی در بیماران	فراوانی الی در افراد کنترل	OR (CI 95%)	P
(تعداد تکرار CA)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)		
۱۴	۷ (۳/۰۴)	۰	۸/۲۵ (۱/۰۲۴-۶۶/۵۱)	۰/۰۱
۱۵	۴۱ (۱۷/۸۲)	۴۵ (۱۹/۵۶)	۰/۸۹ (۰/۵۵۸-۱/۴۲۶)	۰/۶۳
۱۶	۶۲ (۲۷)	۶۶ (۲۸/۶۹)	۰/۹۱ (۰/۶۱-۱/۳۷۹)	۰/۶۷
۱۷	۴۷ (۲۰/۴۳)	۴۷ (۲۰/۴۳)	۱ (۰/۶۳۶-۱/۵۷۳)	۱
۱۸	۴۷ (۲۰/۴۳)	۴۵ (۱۹/۵۶)	۱/۰۵ (۰/۶۶۹-۱/۶۶۸)	۰/۸۱
۱۹	۲۰ (۸/۶۹)	۲۱ (۹/۱۳)	۰/۹۴ (۰/۴۹۹-۱/۸)	۰/۸۷
۲۰	۳ (۱/۳)	۱ (۰/۴۳)	۳/۰۲ (۰/۳۱۲-۲۹/۳۱۲)	۰/۳۱
۲۱	۲ (۰/۸۶)	۲ (۰/۸۶)	۱ (۰/۱۴-۷/۱۶)	۱
۲۳	۱ (۰/۴۳)	۳ (۱/۳)	۰/۳۳ (۰/۰۳۴-۳/۲)	۰/۳۱
جمع	۲۳۰ (۱۰۰)	۲۳۰ (۱۰۰)	-	-

بیماران و ترکیبات اللی (۱۶/۲۱، ۱۷/۲۳ و ۱۹/۲۳) فقط در افراد کنترل مشاهده شد (جدول شماره ۲).
از طرف دیگر در تجزیه و تحلیل نتایج مربوط به فراوانی ترکیبات اللی در میان دو گروه بیمار و کنترل، فراوانی افراد حامل ال ۱۴ تکرار CA در بین افراد بیمار بیشتر از افراد کنترل ($P=0.01$ و $OR=8.5$) مشاهده شد (جدول شماره ۳).

در کل افراد مورد مطالعه، ۲۷ ترکیب اللی (ژنوتیپ) مختلف برای ژن NF B1 مشاهده شد. نتایج بررسی ژنوتیپ‌های مختلف ژن NF B1 نشان داد که فراوانترین ژنوتیپ موجود در هر دو گروه بیمار (۱۵/۶۵ درصد) و کنترل (۱۴/۷۸ درصد) متعلق به ژنوتیپ (۱۶/۱۶) است، به علاوه ترکیبات اللی (۱۴/۱۷، ۱۴/۱۶، ۱۴/۱۸، ۱۴/۱۹، ۱۵/۲۱، ۱۶/۲۰ و ۱۷/۲۰) فقط در

جدول شماره ۲: فراوانی و درصد ژنوتیپ‌های مختلف تکرار CA واقع در ناحیه‌ی اینترونی ژن NFKB1 در بیماران و افراد کنترل در جمعیت اصفهان

ژنوتیپ	گروه بیمار تعداد (درصد)	گروه کنترل تعداد (درصد)	OR (CI 95%)	P
۱۴/۱۶	۲ (۱/۷۳)	۰	$>3/0.8(0.316-30/0.47)$	۰/۳۰
۱۴/۱۷	۲ (۱/۷۳)	۰	$>3/0.8(0.316-30/0.47)$	۰/۳۰
۱۴/۱۸	۱ (۰/۸۶)	۰	$>2/0.1(0.18-22/56)$	۰/۵۶
۱۴/۱۹	۲ (۱/۷۳)	۰	$>3/0.8(0.316-30/0.47)$	۰/۳۰
۱۵/۱۵	۷ (۶/۰۸)	۱۰ (۸/۶۹)	$0/68(0.25-1/855)$	۰/۴۴
۱۵/۱۶	۶ (۵/۲۱)	۲ (۱/۷۳)	$3/11(0.614-15/744)$	۰/۱۵
۱۵/۱۷	۵ (۴/۳۴)	۵ (۴/۳۴)	$1(0.282-3/552)$	۱
۱۵/۱۸	۱۴ (۱۲/۱۷)	۱۴ (۱۲/۱۷)	$1(0.454-2/204)$	۱
۱۵/۲۱	۱ (۰/۸۶)	۰	$>2/0.1(0.18-22/56)$	۰/۵۶
۱۶/۱۶	۱۸ (۱۵/۶۵)	۱۷ (۱۴/۷۸)	$1/0.7(0.521-2/197)$	۰/۸۵
۱۶/۱۷	۷ (۶/۰۸)	۹ (۷/۸۲)	$0/76(0.274-2/124)$	۰/۶۰
۱۶/۱۸	۵ (۴/۳۴)	۱۰ (۸/۶۹)	$0/47(0.158-1/443)$	۰/۱۸
۱۶/۱۹	۸ (۶/۹۵)	۱۳ (۱۱/۳۰)	$0/58(0.233-1/474)$	۰/۲۵
۱۶/۲۰	۱ (۰/۸۶)	۰	$>2/0.1(0.18-22/56)$	۰/۵۶
۱۶/۲۱	۰	۱ (۰/۸۶)	$>0/49(0.044-5/543)$	۰/۵۶
۱۷/۱۷	۱۱ (۹/۵۶)	۱۰ (۸/۶۹)	$1/11(0.452-2/727)$	۰/۸۱
۱۷/۱۸	۸ (۶/۹۵)	۵ (۴/۳۴)	$1/64(0.522-5/188)$	۰/۳۹
۱۷/۱۹	۱ (۰/۸۶)	۱ (۰/۸۶)	$1(0.062-16/183)$	۱
۱۷/۲۰	۱ (۰/۸۶)	۰	$>2/0.1(0.18-22/56)$	۰/۵۶
۱۷/۲۳	۰	۱ (۰/۸۶)	$>0/49(0.044-5/543)$	۰/۵۶
۱۸/۱۸	۶ (۵/۲۱)	۵ (۴/۳۴)	$1/21(0.359-4/0.86)$	۰/۷۵
۱۸/۱۹	۴ (۳/۴۷)	۱ (۰/۸۶)	$4/10(0.452-37/33)$	۰/۱۷
۱۸/۲۰	۱ (۰/۸۶)	۱ (۰/۸۶)	$1(0.062-16/183)$	۱
۱۸/۲۳	۱ (۰/۸۶)	۱ (۰/۸۶)	$1(0.062-16/183)$	۱
۱۹/۱۹	۲ (۱/۷۳)	۷ (۶/۰۸)	$0/27(0.055-1/344)$	۰/۰۸
۱۹/۲۱	۱ (۰/۸۶)	۱ (۰/۸۶)	$1(0.062-16/183)$	۱
۱۹/۲۳	۰	۱ (۰/۸۶)	$>0/49(0.044-5/543)$	۰/۵۶
کل	۱۱۵ (۱۰۰)	۱۱۵ (۱۰۰)	-	-

جدول شماره ۳: بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌های حامل الل کوتاه CA و ریسک ابتلا به سرطان پستان

ژنوتیپ	بیمار	کنترل	OR (CI 95%)	P
(CA) ₁₄ /(CA) ₁₆₋₁₉	۷ (٪۶)	۰	۸/۵ (۱/۰۴۸-۶۹/۲۴۳)	۰/۰۱

بحث:

در این مطالعه برای اولین بار در جمعیت اصفهان ارتباط بین پلی مورفیسم میکروستلایت تکرار دو نوکلئوتیدی CA در اینترون شماره یک ژن فاکتور هسته‌ای B1 (NF B1) با سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت و نه الل مختلف در محدوده‌ی ۱۴-۲۳ تکرار و ۲۷ ترکیب ژنوتیپی مختلف بین افراد بیمار و کنترل مشاهده شد. بر اساس نتایج، پراکندگی الل‌ها در بین دو گروه بیمار و کنترل از الگوی یکسانی پیروی نمی‌کند؛ به ویژه در خصوص الل ۱۴ تکرار CA، این الل در غالب چهار نوع ترکیب اللی و فقط در بیماران قابل مشاهده است. با توجه به اینکه الل ۱۴ تکرار CA تنها الل با فراوانی متفاوت در بین دو گروه بیمار (۳/۰۴ درصد) و کنترل (۰ درصد) بود، به نظر می‌رسید این الل به شکل معنی داری با خطر ابتلا به سرطان پستان در ارتباط باشد. بدین ترتیب، با انجام مطالعات آماری ارتباط معنی داری بین حضور الل ۱۴ تکرار CA و خطر ابتلا به سرطان پستان با نسبت افزایشدهنده (OR= ۸ و CI= ۱/۰۲۴-۶۶/۵۱) و سطح معنی داری (P=۰/۰۱) به دست آمد. به این ترتیب افراد دارای الل ۱۴ تکرار CA حداقل هشت برابر بیشتر از سایر افراد در معرض خطر ابتلا به سرطان پستان هستند. از آنجا که این الل، تنها در افراد بیمار مشاهده شد، با توجه به نسبت افزایشدهنده بزرگتر از هشت، پس از بررسی نمونه‌های بیشتر و اطمینان کامل از نتایج این تکرار اللی می‌تواند به عنوان یک مارکر پیش‌آگاهی سرطان پستان مورد استفاده قرار گیرد. توالی‌های میکروستلایتی در سرتاسر ژنوم انسان پراکنده شده‌اند و پلی مورفیسم‌های متنوعی در طول خود نشان می‌دهند. در میان تکرارهای دی‌نوکلئوتیدی، تکرارهای (CA-) n (TG/CA) شایع‌ترین نوع میکروستلایت‌ها در مهره‌داران و انسان‌ها هستند و در صدها ژن انسانی

حضور دارند (۲۳). دی‌نوکلئوتیدهای CA به خاطر ساختار متناوب پورین/پیریمیدین خود تمایل به تشکیل ساختارهای Z-DNA تحت شرایط فیزیولوژیکی دارند که نشان‌دهنده‌ی نقش احتمالی عناصر Z در فعال‌سازی کروماتین یا بازآرایی ژنوم است. این ویژگی تکرارهای CA ممکن است حرکت RNA پلیمراز را تحت تأثیر قرار داده و در تنظیم بیان ژن دخالت داشته باشد. از طرف دیگر بررسی تکرارهای CA در بسیاری از ژن‌های انسانی نشان داده که تکرارهای اینترونی CA می‌توانند به عنوان تقویت‌کننده‌ها یا سرکوب‌کننده‌های پردازش عمل کرده و در تنظیم پردازش متناوب نیز نقش داشته باشند (۲۱).

مطالعات نشان داده‌اند که فراوانی تکرارهای اینترونی CA و بیان برخی از ژن‌های خانه‌دار (با سطوح بیان بالا)، به شکل معکوسی در ارتباط بوده و نشان‌دهنده‌ی یک مکانیزم کلی بیان ژن است (۲۴)؛ بنابراین به نظر می‌رسد این تکرارهای اینترونی در تنظیم بیان سایر ژن‌های انسان نیز دخالت داشته باشند. اخیراً ارتباط بین تکرارهای پلی‌مورفیک CA به ویژه در اینترون‌های اولیه با بیان برخی از ژن‌های دخیل در سرطان یا سایر بیماری‌ها از جمله ژن‌های کدکننده‌ی فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR)، هیدروکسی‌استروئید (۱۱ بتا) دهیدروژناز ۲ (HSD11B2) و اینترفرون گاما (IFNG) گزارش شده و نشان‌دهنده‌ی ارتباط بین میزان بیان ژن و وضعیت پلی‌مورفیک تکرارهای CA در نواحی اینترونی ابتدایی است. با وجودی که بیان ژن می‌تواند توسط عوامل ژنتیکی و غیر ژنتیکی متعددی از جمله عوامل تنظیمی سیس و ترانس، تنوعات تعداد کپی (CNV) و متیلاسیون DNA تحت تأثیر قرار گیرد، بررسی ژن‌های با ساختار مشابه با این ژن‌ها می‌تواند شواهدی در جهت

حمایت از نقش تکرارهای اینترونی CA به عنوان تنظیم کننده های عمومی بیان ژن ارائه کند (۲۳). عوامل مختلفی در سطح DNA شناسایی شده اند که می توانند در دستیابی به سطوح بالای رونویسی در یوکاریوت ها مؤثر باشند، از جمله طول ژن که مشخص شده ژن های با میزان رونویسی بالا در بافت های مختلف در مقایسه با سایر ژن ها کوتاه ترند (۲۵). این مسئله می تواند در انتخاب ژن های با طول کوتاه (مانند ژن های خانه دار) با هدف میزان بالای رونویسی و در نتیجه به حداقل رساندن مصرف انرژی حین رونویسی اهمیت داشته باشد. مشاهدات نشان داده که ژن های با اینترون های بلند، تعداد تکرارهای بیشتری در مقایسه با ژن های با اینترون های کوتاه دارند و ژن های با میزان بیان بالا تمایل به داشتن نسبت کمتری از تکرارهای (TG/CA)_n دارند (۲۴). همانطور که اشاره شد تکرارهای (TG/CA)_n فراوانترین تکرارها (۵۰٪) در سرتاسر ژنوم هستند و اغلب در اینترون ها واقع شده اند (۲۶). تکرارهای بلند (کوچکتر از ۱۲ واحد تکراری) (TG/CA)_n در مقایسه با تکرارهای کوتاه (۶-۱۲) بسیار پلی مورفیک و عملکردی هستند و می توانند تأثیر کاهشی بر بیان رونویسی داشته باشند و این تأثیر کاهشی می تواند با افزایش طول واحد تکراری افزایش یابد (۲۴). بیش از ۹۰٪ تکرارهای CA ای که بیش از ۱۲ واحد تکراری دارند، پلی مورفیسم هایی در طول خود نشان می دهند و ممکن است به عنوان تنظیم کننده های Cis (Cis-regulators) رونویسی عمل کنند. به طور کلی این نوع تکرارهای CA در ژن های خانه داری که به شدت بیان می شوند، تأثیر کاهشی بر بیان رونویسی دارد و بیانگر ارتباط معکوس با تعداد تکرارها در اینترون ها است (۲۴).

بنابراین با توجه به اینکه در این پژوهش مشخص شد که الل کوتاه تکرار CA ژن NF B1 با استعداد ابتلا به سرطان در ارتباط است و با توجه به میزان بالای بیان یا فعالیت فاکتور NF B در نمونه های سرطانی، از آنجایی که افزایش تکرارها بر طبق مطالب ذکر شده، تأثیر کاهشی بر بیان رونویسی دارد، ممکن است تکرارهای

کوتاه CA با افزایش بیان این ژن در ارتباط باشد. از طرف دیگر DNA های ماهواره ای ریز یا STR ها با قرار گرفتن در توالی افزایش دهنده ها و احتمالاً با تغییر ساختمان ایجاد شده می توانند بر روی بیان ژن ها تأثیر بگذارند. STR ها همچنین با قرار گرفتن در اینترون ها و تغییر ساختمان ایجاد شده می توانند در سرعت جدا شدن اینترون ها و در نتیجه بیان ژن ها تأثیر گذارند. به علاوه، لازم به ذکر است که بررسی میزان بیان ژن NF B1 در افراد دارای الل ۱۴ تکرار CA در مقایسه با سایر افراد می تواند به عنوان تکمیل کننده نتایج این تحقیق باشد که در مراحل بعدی تحقیق به آن نیاز است.

نتیجه گیری:

با بررسی پلی مورفیسم تکرار CA در اینترون شماره یک ژن NF B1 مشخص شد که افراد حامل الل ۱۴ تکرار CA ژن NF B1 خطر افزایش یافته ای برای ابتلا به سرطان پستان دارند. به ویژه از آنجا که الل ۱۴ تکرار CA تنها در افراد بیمار مشاهده شد و با توجه به نسبت افزایشنده بزرگتر از هشت، ممکن است این تکرار اللی بتواند به عنوان یک مارکر پیش آگاهی سرطان پستان مورد استفاده قرار گیرد. با این وجود، انجام تحقیقات بیشتر بر روی جمعیت بزرگتر برای تأیید ارتباط بین الل ها و ژنوتیپ های مختلف با سطح بیان ژن و خطر ابتلا به سرطان پستان نیاز است.

تشکر و قدردانی:

در پایان از حمایت معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان در راستای انجام این پروژه، از کلیه ی بیماران محترم، بیمارستان سیدالشهدای اصفهان به خاطر در اختیار قرار دادن اطلاعات پزشکی و نمونه خون بیماران و خانم الهه جان نثاری به خاطر یاری ایشان در جمع آوری نمونه ها و کلیه ی افرادی که به صورت مادی و معنوی ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند، تشکرو قدردانی می گردد.

منابع:

1. Razavi SE, Aaghajani H, Haghazali M, Nadali F, Ramazani R, Dabiri E, et al. The most common cancers in Iranian women. *Iran J Public Health*. 2009; 38: 109-12.
2. Rezaianzadeh A, Heydari ST, Hosseini H, Haghdooost AA, Barooti E, Lankarani KB. Prevalence of breast cancer in a defined population of Iran. *Iran Red Crescent Med J*. 2011; 13(9): 647-50.
3. Yavari P, Hislop TG, Abanto Z. Methodology to identify Iranian immigrants for epidemiological studies. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2005; 6(4): 455-7.
4. Zare N, Doostfateme M, Rezaianzadeh A. Modeling of breast cancer prognostic factors using a parametric log-logistic model in Fars province, Southern Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13(4): 1533-7.
5. Noroozi A, Jomand T, Tahmasebi R. Determinants of breast self-examination performance among Iranian women: an application of the health belief model. *J Cancer Educ*. 2011; 26(2): 365-74.
6. Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran. *Ann Oncol*. 2009; 20(3): 556-63.
7. Harirchi I, Kolahdoozan S, Karbakhsh M, Chegini N, Mohseni SM, Montazeri A, et al. Twenty years of breast cancer in Iran: down staging without a formal screening program. *Ann Oncol*. 2011; 22(1): 93-7.
8. Sun XF, Zhang H. NFKB and NFKBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. *Histol Histopathol*. 2007; 22(12): 1387-98.
9. O'Dea E, Hoffmann A. NF- B signaling. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biol Med*. 2009; 1(1): 107-15.
10. Chen CD, Sawyers CL. NF-kappa B activates prostate-specific antigen expression and is upregulated in androgen-independent prostate cancer. *Mol Cell Biol*. 2002; 22(8): 2862-70.
11. Biswas DK, Dai SC, Cruz A, Weiser B, Graner E, Pardee AB. The nuclear factor kappa B (NF-kappa B): a potential therapeutic target for estrogen receptor negative breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(18): 10386-91.
12. Lind DS, Hochwald SN, Malaty J, Rekkas S, Hebig P, Mishra G, et al. Nuclear factor- B is unregulated in colorectal cancer. *Surgery*. 2001; 130(2): 363-9.
13. Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1999; 19(9): 5923-9.
14. Uranishi H, Tetsuka T, Yamashita M, Asamitsu K, Shimizu M, Itoh M, et al. Involvement of the pro-oncoprotein TLS (translocated in liposarcoma) in nuclear factor-kappa B p65-mediated transcription as a coactivator. *J Biol Chem*. 2001; 276(16): 13395-401.
15. Sarkar DK, Jana D, Patil PS, Chaudhari KS, Chattopadhyay BK, Chikkala BR, et al. Role of NF-kappa B as a prognostic marker in breast cancer: a pilot study in Indian patients. *Indian J Surg Oncol*. 2013; 4(3): 242-7.
16. Jiao X, Wood LD, Lindman M, Jones S, Buckhaults P, Polyak K, et al. Somatic mutations in the Notch, NF-KB, PIK3CA, and Hedgehog pathways in human breast cancers. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012; 51(5): 480-9.
17. Bours V, Dejjardin E, Goujon-Letawe F, Merville M-P, Castronovo V. The NF- B transcription factor and cancer: high expression of NF- B-and I B-related proteins in tumor cell lines. *Biochem Pharmacol*. 1994; 47(1): 145-9.

18. Cogswell PC, Guttridge DC, Funkhouser WK, Baldwin AS, Jr. Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene*. 2000; 19(9): 1123-31.
19. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998; 16: 225-60.
20. Le Beau MM, Ito C, Cogswell P, Espinosa R, 3rd, Fernald AA, Baldwin AS, Jr. Chromosomal localization of the genes encoding the p50/p105 subunits of NF-kappa B (NFKB2) and the I kappa B/MAD-3 (NFKBI) inhibitor of NF-kappa B to 4q24 and 14q13, respectively. *Genomics*. 1992; 14(2): 529-31.
21. Hui J, Hung LH, Heiner M, Schreiner S, Neumuller N, Reither G, et al. Intronic CA-repeat and CA-rich elements: a new class of regulators of mammalian alternative splicing. *EMBO J*. 2005; 24(11): 1988-98.
22. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(3): 1215.
23. Zhang W, He L, Liu W, Sun C, Ratain MJ. Exploring the relationship between polymorphic (TG/CA) n repeats in intron 1 regions and gene expression. *Hum Genomics*. 2009; 3(3): 236-45.
24. Sharma VK, Kumar N, Brahmachari SK, Ramachandran S. Abundance of dinucleotide repeats and gene expression are inversely correlated: a role for gene function in addition to 25. intron length. *Physiol Genomics*. 2007; 31(1): 96-103.
25. Urrutia AO, Hurst LD. The signature of selection mediated by expression on human genes. *Genome Genome Res*. 2003; 13(10): 2260-4.
26. Sharma VK, Brahmachari SK, Ramachandran S. (TG/CA) n repeats in human gene families: abundance and selective patterns of distribution according to function and gene length. *BMC Genomics*. 2005; 6: 83.

Association between the polymorphism of CA dinucleotide repeat in intron 1 of *NF B1* gene and risk of breast cancer

Kamali E¹, Tavassoli M^{2*}, Hemmati S³

¹Student, Biology Dept., University of Isfahan, Isfahan, I.R. Iran; ²Biology Dept., University of Isfahan, Isfahan, I.R. Iran; ³Radiation Oncology Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran.

Received: 21/Jul/2014 Accepted: 7/Oct/2014

Background and aims: *NF B1* encodes for a DNA binding subunit of NF- B complex. Overexpression of *NF B1* has been reported in a number of human cancers including breast cancer. To date there has been no study on the relation between microsatellites in the *NF B1* gene and risk of breast cancer in Isfahan population. This study was aimed to investigate the existence of *NF B1* CA repeat polymorphism and its association with breast cancer risk in Isfahan population.

Methods: This case-control study was conducted on 115 women with breast cancer and 115 healthy women. After DNA extraction from peripheral blood samples, desired sequence was amplified by polymerase chain reaction. Finally, CA repeat polymorphism was determined by amplified elements electrophoresis on polyacrylamide gel and determination of sequencing.

Results: According to the results of present study, 9 different alleles of the CA repeat in the range of 14 to 23 were detected in intron 1 of *NF B1* gene. The most common allele in both controls (28.69%) and cases (27%) allocated to (CA)₁₆ allele. Due to the short allele (CA)₁₄ frequency in patients (3.04%) and controls (0%), women who carry (CA)₁₄ allele of *NF B1* gene were at significantly higher risk of developing breast cancer.

Conclusion: Since the (CA)₁₄ allele was observed only in patient women with the OR>8, it may be used as a prognosis marker for breast cancer development.

Keywords: Breast cancer, Nuclear factor of B1 (NF B1), CA repeat, Polymorphism.

Cite this article as: Kamali E, Tavassoli M, Hemmati S. Association between the polymorphism of CA dinucleotide repeat in intron 1 of *NF B1* gene and risk of breast cancer. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(3): 13-21.

***Corresponding author:**

Biology Dept., University of Isfahan, Isfahan, I.R. Iran, Tel: 00983137932477,
E-mail: manoochehrt@yahoo.com